昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, January 2007, 50(1): 90 - 94　　ISSN 0454-6296

不同寄主蒲螨种群间亲缘关系的 RAPD 初步分析

韩继成，于丽辰*，贺丽敏，郝宝峰，许长新
(河北省农林科学院昌黎果树研究所，河北昌黎　066600)

摘要：应用 RAPD 技术分析了采自河北昌黎和天津蓟县等不同地点的 9 个不同寄主的蒲螨种群间的关系。通过对 100 条 RAPD 引物的 3 次重复筛选，获得 32 条重复性好、多态性高的引物。应用这 32 条引物共扩增出 268 条带，依据这些条带计算遗传距离，再进行聚类分析。结果表明：9 个蒲螨种群可分为 3 个组(A、B 和 C 组)。其中 A 和 B 组属于小蠹蒲螨群，A 组由护林神蒲螨 *Pyemotes dryas* 组成；B 组由小蠹蒲螨 *P. scolyti* 和寄生于松树小蠹 *Scolytidae* sp. 的蒲螨组成；球腹蒲螨群组成 C 组，并分为两个分支，寄生于桃树小蠹寄生蜂 *Pteromalidae* spp. 的蒲螨为一支，寄生于柏肤小蠹 *Phloeosinus aubei* Perris、皮蠹 *Dermestidae* sp.、日本二齿茎长蠹 *Sinoxylon japonicum* Lesne(黑枣树和柿树)和桑梢小蠹 *Cryphalus exignus* 等的 5 个蒲螨种群为一支，这 5 个蒲螨种群形态上未见明显差别。C 组中的寄生桃树小蠹寄生蜂的蒲螨与该组其他蒲螨种群的遗传距离最远，达到 0.3236 ~ 0.4111，并且存在生殖隔离，该蒲螨似已分化成为独立的新种；C 组其他种群是否存在近缘种，有待进一步深入研究。

关键词：蒲螨；寄主；分化；RAPD；亲缘关系
中图分类号：Q969　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)01-0090-05

The RAPD analysis on the phylogeny of *Pyemotes* spp. on different hosts

HAN Ji-Cheng, YU Li-Chen*, HE Li-Min, HAO Bao-Feng, XU Chang-Xin (Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China)

Abstract: The *Pyemotes* is one of the most important natural enemies of the bark pests, and spreads widely in China. It is difficult to identify the relationships among the *Pyemotes* populations on different hosts because of their belonging to closely related species undistinguishable by morphological characters. The RAPD analysis of 9 populations of *Pyemotes* on different hosts collected from Changli County, Hebei Province and Jixian County, Tianjin City were carried out to explore the relationships among these *Pyemotes* populations. Thirty-two primers with high polymorphic and steady bands were obtained after selecting in 100 primers repeatedly. The results of phylogeny analysis based on the genetic distances of the tested 9 populations indicated that the they could be divided into three groups (A, B and C). Group A contains *Pyemotes dryas* only; Group B contains *P. scolyti* and the *Pyemotes* parasitizing *Scolytidae* spp.; Group C are divided further into two subgroups, one is the *Pyemotes* parasitizing *Pteromalidae* spp., and another contains the *Pyemotes* parasitizing *Phloeosinus aubei* Perris, *Dermestidae* sp., *Sinoxylon japonicum* Lesne, and *Cryphalus exignus*, respectively. Reproductive isolation was found between the population of *Pyemotes* parasitizing *Pteromalidae* spp. and others, which suggests that the former should be a different new species.

Key words: *Pyemotes*; host; diversification; RAPD; phylogeny

蒲螨 *Pyemotes* 隶属蜱螨目(Acari)蒲螨科(Pyemotidae)蒲螨属 *Pyemotes*，该属全部为昆虫外寄生螨，个体微小，体长仅 200 μm，是钻蛀性和群居性害虫(如小蠹虫、长蠹、吉丁虫、红铃虫和梨小食心虫等)的重要天敌之一，含有对昆虫高毒而对哺乳动物安全的神经毒素，具有广阔应用前景。到目前为止

基金项目：国家自然科学基金(397706222)；河北省自然科学基金(302446)
作者简介：韩继成，男，1969 年生，硕士，研究方向为蒲螨进化和毒素基因克隆研究，E-mail：hanjicheng@sina.com
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: yulichen@heinfo.net
收稿日期 Received: 2006-07-17；接受日期 Accepted: 2006-10-26

全世界已发表 15 个种，其中 1 种是我国发表的莫氏蒲螨 *P. moseri* (Yu and Liang, 1996)。根据蒲螨的形态和寄主范围，美国学者 Cross 和 Moser (Cross and Moser, 1975) 将该属划分成 2 个组，即小蠹蒲螨群 (*Scolyti* group) 和球腹蒲螨群 (*Ventricosus* group)，小蠹蒲螨群的种类仅寄生小蠹虫，有的雄螨出现极端的多态现象；球腹蒲螨群则寄主广泛，主要包括鞘翅目、鳞翅目、膜翅目等的昆虫，某些种甚至可以袭击和取食成虫，没有发现雄螨的多态现象，全部为单一形态；并报道了球腹蒲螨群中存在与虱状蒲螨 *P. tritici* 和赫氏蒲螨 *P. herfsi* 近似的种类，但至今未见对近似种如何区分的报道。蒲螨在我国分布广泛，经调查南至秦岭，北至黑龙江，西至新疆均有发现。在已掌握的我国的相关资源中属于小蠹蒲螨群的有 3 个种，球腹蒲螨群中有 4～5 个种，1 个已发表的新种，3～4 个与 *P. tritici* 近缘的种类，形态上尚未找到有效的区分特征，但生物学、生态学上存在差异，种群间杂交有的组合表现出不亲和，甚至雌螨将雄螨咬死。如果不能明确地进行种的界定，将给进一步的应用研究造成很多困难。RAPD 技术是由 Williams 和 Welsh 发展的简单、快捷的 DNA 水平上的多态检测技术，主要用于物种亲缘关系、系统分类等方面的研究 (Williams, *et al.*, 1990; Welsh and McClelland, 1990)。该技术在生物以及昆虫分类研究中得到广泛应用(鲁亮和归鸿，1995)。并已成功应用于蚱属种间(蒋国芳等，2002)和桃蛀果蛾(徐庆刚和花保祯，2004)亲缘关系的鉴定。本文在传统形态学分类鉴定的基础上，应用 RAPD 技术对采集到的 9 个蒲螨种群进行了初步分析，探讨其亲缘关系，辅助形态分类，为种的区分提供分子学上的证据。

1　材料和方法

1.1　供试蒲螨

不同寄主上的蒲螨均采自野外，1996－2004 年共采集了 9 种寄主上的蒲螨，采集地点和寄主列于表 1。各供试蒲螨的保存和繁殖按照于丽辰等 (1997) 的方法。

表 1　供试蒲螨编号和采集信息

Table 1　Collection data of *Pyemotes* populations assayed

编号 No	种类 Species	分组 Group	寄主 Host	采集地点 Location	采集时间(年/月) Collecting date (year/month)
01	护林神蒲螨 *Pyemotes dryas*	小蠹蒲螨群 *Scolyti* group	柏树肤小蠹 *Phloeosinus* spp.	河北昌黎 Changli, Hebei	1996/8
02	小蠹蒲螨 *Pyemotes scolyti*	小蠹蒲螨群 *Scolyti* group	桃树小蠹虫 *Scolytus seulensis* Murayama	河北昌黎 Changli, Hebei	2001/7
03	*Pyemotes* sp.03	球腹蒲螨群 *Ventricosus* group	果树小蠹虫道的皮蠹 *Dermestidae* spp.	河北昌黎 Changli, Hebei	1996/8
04	*Pyemotes* sp.04	球腹蒲螨群 *Ventricosus* group	日本二齿茎长蠹(黑枣) *Sinoxylon japonicum* Lesne	天津蓟县 Jixian, Tianjin	2002/4
05	*Pyemotes* sp.05	球腹蒲螨群 *Ventricosus* group	桃树小蠹寄生蜂 *Pteromalidae* spp.	河北昌黎 Changli, Hebei	2002/4
06	*Pyemotes* sp.06	球腹蒲螨群 *Ventricosus* group	柏肤小蠹 *Phloeosinus aubei* Perris	天津蓟县 Jixian, Tianjin	2003/7
07	*Pyemotes* sp.07	球腹蒲螨群 *Ventricosus* group	桑梢小蠹 *Cryphalus exignus*	天津蓟县 Jixian, Tianjin	2002/4
08	*Pyemotes* sp.08	小蠹蒲螨群 *Scolyti* group	松树小蠹 *Scolytidae* spp.	天津蓟县 Jixian, Tianjin	2004/9
09	*Pyemotes* sp.09	球腹蒲螨群 *Ventricosus* group	日本二齿茎长蠹(柿树) *Sinoxylon japonicum* Lesne	河北昌黎 Changli, Hebei	1998/7

注 Notes：所有标本保存在昌黎果树研究所。All specimens are deposited in Changli Institute of Pomology, Changli, Hebei.

1.2　基因组 DNA 提取

各供试蒲螨种群的单头保种的后代分别投放到桃小蠹虫上，于 25℃条件下生长 6～7 天，发育成膨腹体后，收集约 50 个雌螨进行培养，发育到膨腹体阶段后移到小指型管中，液氮速冻，然后按“蛋白酶 K 消化裂解法”提取基因组 (Sambrook and Russell, 2001)。

1.3　RAPD 分析

RAPD 引物(多态性引物序列及编号见表 2)和相关试剂购自赛百盛基因技术有限公司(北京)。PCR 反应体系为 20 μL，含 1×PCR 反应缓冲液、1.5 mmol/L $MgCl_2$、0.2 mmol/L dNTPs、20 pmol/L 的随机引

物、50 ng模板DNA和1.25 U Taq聚合酶。扩增反应在MJ Research公司的PTC-100型PCR仪上进行,反应参数为:94℃预变性5 min后,92℃变性30 s,36℃退火1 min,72℃延伸90 s,循环40次,最后72℃延伸10 min,PCR结束后保持18℃。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电用后用UVP公司的GDS8000凝胶成像仪拍照。Marker为Promega公司的λDNA/*Hin*d Ⅲ(片段长度:23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564, 125 bp)。

1.4 RAPD结果的数据处理

以某一DNA片段在某样品中出现赋值"1",不出现赋值"0"为依据产生二态性状集,用RAPDistance2.0程序(Armstrong *et al*., 1994)将扩增片段的二态数据转换成距离数据,计算出的距离距阵用PHYLIP3.6程序包中的NEIGHBOR程序(Felsenstein, 2004)(UPGMA法)进行聚类,分析样品间亲缘关系的远近。

表2 多态性引物编号及序列

Table 2 The names and sequences of polymorphism between the nine *Pyometes* populations on different hosts

引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')
SBSA01	CAGGCCCTTC	SBSA02	TGCCGAGCTG	SBSA03	AGTCAGCCAC	SBSA04	AATCGGGCTG
SBSA07	GAAACGGGTG	SBSA09	GGGTAACGCC	SBSA10	GTGATCGCAG	SBSA11	CAATCGCCGT
SBSA13	CAGCACCCAC	SBSA14	TCTGTGCTGG	SBSA20	GTTGCGATCC	SBSB05	TGCGCCCTTC
SBSC01	TTCGAGCCAG	SBSC08	TGGACCGGTG	SBSD05	TGAGCGGACA	SBSD07	TTGGCACGGG
SBSD18	GAGAGCCAAC	SBSD20	ACCCGGTCAC	SBSE03	CCAGATGCAC	SBSE04	GTGACATGCC
SBSE07	AGATGCAGCC	SBSE16	GGTGACTGTG	SBSF09	CCAAGCTTCC	SBSF12	ACGGTACCAG
SBSG16	AGCGTCCTCC	SBSG17	ACGACCGACA	SBSH18	GAATCGGCCA	SBSI06	AAGGCGGCAG
SBSL16	AGGTTGCAGG	SBSM02	ACAACGCCTC	SBSN18	CACCATCCGT	SBSS04	CACCCCCTTG

2 结果与分析

2.1 基因组DNA提取

应用"蛋白酶K消化裂解法"提取蒲螨DNA,获得了完整的基因组DNA(图1)。通过OD_{260}值将每个蒲螨的DNA浓度调至50 ng/μL后用于PCR反应。

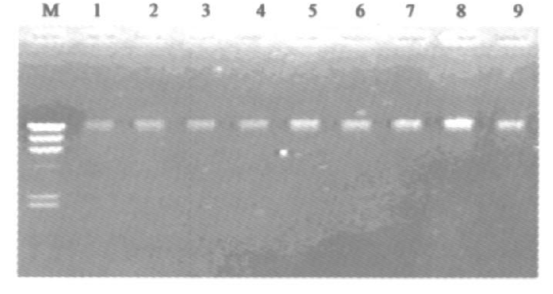


图1 提取的蒲螨基因组DNA

Fig. 1 The genomic DNA of *Pyometes*

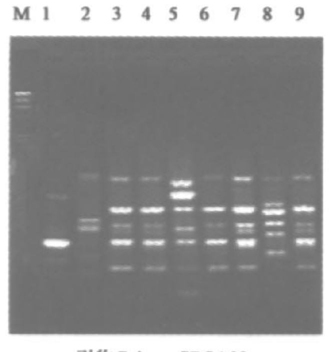
M: Marker; 1~9分别是01、02、03、04、05、06、07、08、09号蒲螨;下同。M: Marker; 1-9 representing no. 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 and 09 *Pyemotes* populations, respectively. The same below.

2.2 不同寄主蒲螨的RAPD多态性

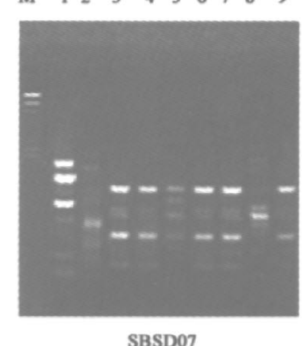
在所使用的100条随机引物中,经三次重复,32条引物(引物名称及序列见表2)在所试的9个蒲螨种群之间获得了清晰、重复性好的多态性条带,占供试引物的32%。9个蒲螨种群扩增的基因组DNA指纹图谱谱带清晰,32条引物分别扩增出4~11个片段,共扩增出268条带,绝大多数片段在0.1~2.0 kb之间(图2)。随机扩增获得不同寄主蒲螨的基因组指纹图谱结果表明不同寄主蒲螨之间存在丰富的遗传多态性,在所扩增出的268条带中只有2条为9个蒲螨种群所共有,其余都不同,显示了不同种群间的遗传变异程度较大。

2.3 不同寄主蒲螨的遗传距离及聚类分析

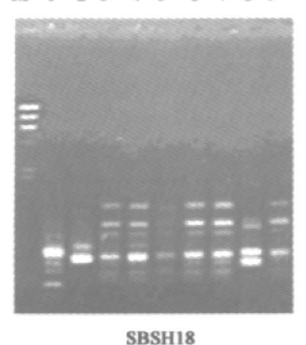
用RAPDistance Package/version2.00计算出9个种群间的Nei氏相似系数,转换成遗传距离(表3),根据遗传距离应用PHYLIP3.6程序包中的NEIGHBOR程序(UPGMA法)进行聚类,从聚类图(图3)可见,9个蒲螨种群分为3个组(A、B和C)。其中A和B组属于小蠹蒲螨群。A组由*Pyemotes dryas*组成;B组由*Pyemotes scolyti*和寄生于松树小蠹的蒲螨组成;C组为球腹蒲螨群,并分为两个大的分支,寄生于桃树小蠹寄生蜂的蒲螨为一支,寄生于柏肤小蠹、果树小蠹虫道的皮蠹、黑枣树的日本二齿茎长蠹的蒲螨、桑梢小蠹的蒲螨和柿树的日本二齿茎长蠹的蒲螨为一支。C组中的寄生桃树小蠹寄生蜂的蒲螨与其他5个种群之间出现了较大的遗传分化,遗传距离达到0.3236~0.4111,杂交试验中(结果待发表),与其中的*Pyemotes* sp.03和*Pyemotes* sp.04不能交尾或交尾的雌螨只产生雄螨,与*Pyemotes* sp.07不交尾并将雄螨咬死。因此,*Pyemotes* sp.05应是一个独立的种,而其他5个种群的遗传距离在0.1079~0.1940之间,可能是同一个种。



引物 Primer SBSA02



SBSD07



SBSH18

图 2 部分引物获得的 RAPD 图谱
Fig. 2 RAPD patterns of some primers

表 3 不同寄主蒲螨的遗传距离
Table 3 Pairwise genetic distance between the *Pyometes populations* on different hosts

	01	02	03	04	05	06	07	08	09
01	0.0000								
02	0.6914	0.0000							
03	0.6176	0.7000	0.0000						
04	0.5616	0.5589	0.1374	0.0000					
05	0.5907	0.7068	0.3236	0.3783	0.0000				
06	0.6391	0.7411	0.1935	0.1940	0.4111	0.0000			
07	0.5922	0.6263	0.1313	0.1079	0.3875	0.1383	0.0000		
08	0.7333	0.6491	0.6684	0.7029	0.7373	0.7401	0.7248	0.0000	
09	0.6500	0.7045	0.1458	0.1690	0.3793	0.1868	0.1546	0.7158	0.0000

注 Notes：物种编号见表 1。Refer Table 1 for the species code.

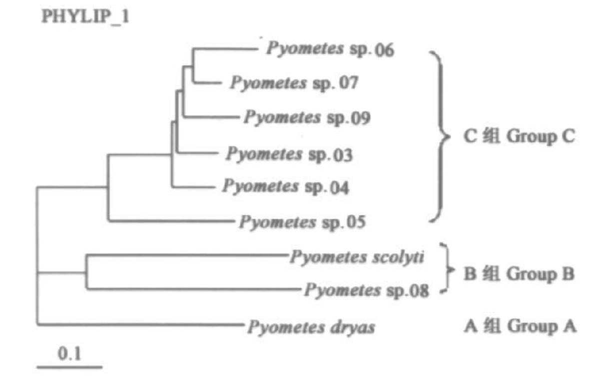


图 3 UPGMA 法进行分析的聚类图
Fig. 3 Phylogenetic tree generated by NEIGHBOR program of PHYLIP

3 讨论

蒲螨 *Pyemotes* 全部为昆虫外寄生螨，体长仅 200 μm 左右，含有对昆虫高毒而对哺乳动物安全的神经毒素。寄主主要是隐蔽性害虫，如小蠹虫、长蠹、吉丁虫、钻蛀性鳞翅目幼虫等。

作者采用 RAPD 技术用来量化蒲螨属几个不同种或种群（不同寄主生物型）之间基因组水平的差异，试材包括了 3 个小蠹蒲螨群的种类，其中 2 个为已知种，1 个未定名种；6 个种群属于球腹蒲螨群，它们在形态上难以区分但有的存在生殖隔离，经分析测定及聚类分析，聚类图中 A 组和 B 组属于小蠹蒲螨群，C 组全部属于球腹蒲螨群，这与形态分类是一致的。因此，RAPD 方法用于蒲螨近缘种的区分有重要参考价值。该组中 *Pyemotes* sp.05 与该组中其他不同寄主的蒲螨种群出现了较大分化，参考杂交试验，可以认为 *Pyemotes* sp.05 是一个独立的种，而其他 5 个种群可能是同一种。这个结果为进一步研究近缘种的形态学差异提供了帮助，在此基础上可以寻找和明确某些细微差异作为种的鉴定依据。

参 考 文 献（References）

Armstrong JS, Gibbs AJ, Peakall R, Weiller G, 1994. The RAPDistance Package/Version 2.00. John. Armsrong@anu.edu.au.

Cross EA, Moser JC, 1975. A new, dimorphic species of *Pyemotes* and a key to previously-described forms (Acarina: Tarsonemoidea). *Annal. Ent. Soc. Am.*, 68(4): 723 - 732.

Felsenstein J, 2004. PHILIP, Phylogeny Inference Package 3.6. http://evolution.gs.Washington.edu/phylip.html.

Jiang GF, Lu G, Huang K, Huang RB, 2002. Studies on genetic variations and phylogenetic relationships among five species of *Tetrix* using RAPD

markers. *Acta Entomol. Sin.*, 45(4): 499 - 502.[蒋国芳，陆敢，黄琨，黄日波，2002. 用 RAPD 标记研究蚱属五个种间的亲缘关系. 昆虫学报，45(4): 499 - 502]

Lu L, Gui H, 1995. The peculiarity of RAPD and its application to insect taxonomy. *Acta Entomol. Sin.*, 38(1): 117 - 122.[鲁亮，归鸿，1995. RAPD 技术的特点及其在昆虫分类中的应用. 昆虫学报，38(1): 117 - 122]

Sambrook J, Russell DW (Translated by Huang PT, Wang JX, Zhu HC), 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Mannual. 3rd ed. Beijing: Science Press. 463 - 472. [Sambrook J, Russell DW(黄培堂，王嘉玺，朱厚础 译)，2002. 分子克隆实验指南(第三版). 北京：科学出版社. 463 - 472]

Welsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids. Res.*, 18(24): 7 213 - 7 218.

Williams JG, Kubelik AR, Livak J, Rafalski JA, Tingey SV, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.*, 18(22): 6 531 - 6 535.

Xu QG, Hua BZ, 2004. RAPD analysis on the speciation in host races of *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae). *Acta Entomol. Sin.*, 47(3): 379 - 383.[徐庆刚，花保祯，2004. 桃蛀果蛾寄主生物型分化的 RAPD 分析. 昆虫学报，47(3): 379 - 383]

Yu LC, Liang LR, 1996. A new species of *Pyemotes* (Acari: Pyemotidae) parasitic on bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Hebei, China. *Syst. Appl. Acarol.*, 6: 167 - 171.

Yu LC, Liang LR, Ao XB, Shi WC, Zhang XY, He LM, 1997. Studies on the morphology and biology of *Pyemotes scolyti* (Oudemans). *Acta Arachnol. Sin.*, 6(5): 46 - 52.[于丽辰，梁来荣，敖贤斌，史文成，张晓元，贺丽敏，1997. 我国新天敌资源——小蠹蒲螨形态与生物学研究. 蛛形学报，6(5): 46 - 52]

(责任编辑：袁德成)

